Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 383- 395

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱ ص.۳۹۵-۳۸۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper

Shelf life extension of chicken fillets by biodegradable chitosan coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil during refrigeration

Zabihalh Bahmani[1*], Parastoo Abolfathi[2]

Received: 2021.04.23
Revised: 2021.06.08
Accepted: 2021.06.20
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Bahmani, Z., Abolfathi, P. (2022). Shelf life extension of chicken fillets by biodegradable chitosan coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil during refrigeration. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 383-395.

Abstract

Introduction: With increasing demand for chicken meat, the chemical composition of meat carcasses has become more important. Despite advances in medical care and food technology in recent years, foodborne infections and food poisoning, as well as food spoilage in developed and developing countries are still a major problem for human health and the economy. During the storage period, the quality characteristics of meat is shortened due to bacterial and oxidative spoilage. Oxidative spoilage causes unpleasant odors, unpleasant changes in taste, and changes in the structure of nutrients and reduces the nutritional value of the product. While spoilage and microbial contamination lead to product wastage and poses serious health risk to consumers. Increasing interest in using less synthetic preservatives has led to use of natural derivatives with antimicrobial properties. Biodegradable coatings are a good alternative to plastic packaging, given the problems they have with recycling and environmental pollution. Chitosan coating containing *Zataria multiflora* essential oil is known to possess good antioxidant and antibacterial properties due to the presence of thymol and carvacrol compounds and their ability to establish hydrogen bonds with other monoterpenes such as γ-tropenes.

Materials and methods: *Zataria multiflora* was purchased in the spring from Sari Medicinal Plants Store. It's essential oil was prepared by distillation method using Clevenger and then dehydrated with sodium sulfate and passed through 0.45 µm syringe filters and stored in dark containers at 4°C (Rezaie et al., 2015).In this study, the use of biodegradable and edible coating of chitosan with thyme essential oil to increase the shelf life of chicken fillets during refrigeration was investigated. Treatments included control, 2% chitosan, 1.5% essential oil and treatment containing 2% chitosan with 1.5% essential oil, which were stored at 4 ° C for 24 days. The antioxidant and antimicrobial properties of chitosan and thyme essential oil were evaluated by measuring the total amount of phenolic compounds, free radical scavenging (DPPH), and FRAP. Quality assessment with chemical tests; pH, TBA, TVB-N, and microbial count (mesophilic bacteria and Pseudomonas) were measured at 4-day intervals.

Results and discussion: The results of quality assessment during the refrigeration period for all treatments showed an increasing trend in pH. TBA (mg MDA/kg fat), TVB-N (mg N/100g), TMC and Pseudomonas (CFU/g) in coated treatments with 2% chitosan and 1.5% essential oil on day 24 of storage were 6.6, 1.78, 26.8, 6.7 and 6.42, respectively, and showed the highest shelf-life. Since, thyme essential oil and chitosan have increased the shelf-life of chicken fillets due to their antioxidant and antimicrobial activity.

The use of biopolymers such as chitosan, gelatin, etc., which have a good ability to maintain and release antioxidant and antimicrobial compounds, is increasing in food packaging. In this study, the preservation effects of chitosan coating

1. Assistant Professor, Department of Biotechnology and Seafood Processing, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Institute of Fisheries Science Research of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization. Bandar Abbas, Iran.
2. MSc in Biotechnology of food science and industry from Rodaki University, Tonekabon, Iran.
(*Corresponding Author Email: zabihbahmani@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69985.1035

containing *Zataria multiflora* essential oil on increasing the shelf life of chicken fillets were investigated and it was found that chitosan coating and *Zataria multiflora* essential oil alone and in combination had good preservation effects. According to the results, 2% chitosan coating containing *Zataria multiflora* essential oil can increase the shelf life of chicken fillets, which is due to the very good performance of chitosan coating containing *Zataria multiflora* essential oil due to its synergistic effect on antimicrobial and antioxidant properties. Between chitosan coating and thyme essential oil in preventing microbial growth and chemical spoilage and shelf life for control treatments, chitosan 2%, thyme essential oil 1.5%, and chitosan 2% containing thyme essential oil 1.5% respectively 8, 16, 16 and 24 days. Therefore, they can be used to store chicken fillets and meat products.

Keywords: Chicken fillet, *Zataria multiflora* Boiss, chitosan, Biodegradable coating.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 383- 395

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۳۹۵-۳۸۳

مقاله علمی-پژوهشی

افزایش عمر ماندگاری فیله مرغ با پوشش زیست تخریب‌پذیر کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) طی نگهداری در یخچال

ذبیح‌اله بهمنی[۱*]- پرستو ابولفتحی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۳۰

چکیده

پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر جایگزین مناسبی برای بسته‌بندی با مواد پلاستیکی، با توجه به مشکلاتی که در بازیافت و آلودگی طبیعت دارند، می‌باشند. در این پژوهش، عمر ماندگاری فیله مرغ با استفاده از پوشش زیست تخریب‌پذیر کیتوزان به همراه اسانس آویشن شیرازی در دمای یخچال (۴± ۲˚C) مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل شاهد، تیمار ۲٪ کیتوزان، تیمار ۱/۵٪ اسانس و تیمار حاوی ۲٪ کیتوزان به‌همراه ۱/۵٪ اسانس بود که به مدت ۲۴ روز در دمای ۴˚C نگهداری شدند. خواص ضدمیکروبی و ضداکسایشی کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی با به‌ترتیب سنجش میزان کل ترکیبات فنولیک، مهار رادیکال آزاد (DPPH) و آزمون احیاء آهن (FRAP) تعیین شد وکیفیت فیله مرغ با آزمون های شیمیایی؛pH، TBA، TVB-N و میکروبی (باکتری‌های مزوفیلو سودوموناس) در فواصل زمانی ۴ روزمورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارزیابی شاخص‌های pH، TBA (mg MDA/kg fat)، TVB-N (mg N/100g)، TMC و سودوموناس (CFU/g) طی دوره نگهداری در یخچال روند افزایشی داشته و مقادیر آن‌ها در روز ۲۴ نگهداری در تیمار شاهد به‌ترتیب ۷/۵، ۲/۹، ۴۳/۵، ۸/۶۷، ۸/۵ و در تیمارهای پوشش دهی شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس ۱/۵٪ به‌ترتیب ۶/۶، ۸/۷۸،۲۶/۱، ۶/۷ و ۶/۴۲ بوده است که به‌ترتیب کمترین و بیشترین عمرماندگاری را نشان دادند. با توجه به این که پوشش حاوی ۲٪ کیتوزان به همراه ۱/۵٪ اسانس آویشن شیرازی باعث افزایش عمر ماندگاری فیله‌های مرغ شده است بنابراین، جهت نگهداری فرآورده های گوشتی مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فیله مرغ، آویشن شیرازی، کیتوزان، پوشش زیست تخریب‌پذیر.

مقدمه

گوشت مرغ ارزان‌ترین نوع گوشت در اکثر کشورها است به همین دلیل در سبد غذایی بیشتر مصرف‌کنندگان وجود دارد. با افزایش تقاضا برای مصرف گوشت مرغ، توجه به کیفیت آن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شد. مهمترین شاخص‌های ارزیابی کیفیت فرآورده‌های گوشتی، عبارتند از شاخص‌های حسی (بافت، رنگ، بو و طعم)، میکروبی و شیمیایی آن است (Seydim et al., 2006). فرآورده‌های گوشت به دلیل دارا بودن عوامل مساعد داخلی برای رشد باکتری‌های ویژه فساد[۳] (SSOs)، محیط مناسبی برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها و واکنش‌های شیمیایی است و در صورت عدم کنترل عوامل خارجی، به سرعت فاسد می‌شود (Nouri et al., 2012). پس از کشتار مجموعه تغییرات شیمیایی، فیزیکی و میکروبی در لاشه گوشت آغاز می‌شود که این تغییرات، موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در خصوصیات کیفی و ارزش غذایی محصول می‌شود. گوشت و فرآورده‌های گوشتی ممکن است به آسانی به میکروب‌های مختلف آلوده شوند. در صورتی که شرایط حمل و نقل و نگهداری آن‌ها مناسب نباشد، باکتری‌های مولد فساد و بیماری زا در گوشت شروع به فعالیت می‌کنند و کیفیت گوشت را کاهش می دهند و ضمن کاهش ارزش تغذیه ای، بهداشت و ایمنی آن را نیز دچار مشکل می‌کنند (Vernozy-Rozand et al., 2002). مجموعه این تغییرات باعث بروز مشکلاتی در نگهداری گوشت و عمر ماندگاری آن

۱- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و فرآوری آبزیان، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. بندرعباس، ایران.
۲- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی علوم و صنایع غذایی دانشگاه رودکی، تنکابن، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: zabihbahmani@gmail.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.69985.1035
۳.Specific Spoilage Organisms

می‌شود. برای ارزیابی کیفیت گوشت، روش‌های مختلفی وجود دارد که پیشرفت این روش‌ها عموما معیاری از کیفیت گوشت است. از جمله تغییراتی که طی نگهداری در گوشت ماکیان اتفاق می‌افتد می‌توان به رشد باکتری‌های مزوفیل، سایکروفیل و تغییرات شیمیایی از قبیل مقدار بازهای ازته فرار (TVB-N)، عدد پراکسید (PV)، شاخص اسید تیوباربیتوریک (TBA) و pH اشاره نمود (Fazlara et al., 2017). محققین صنعت غذا تاکنون پژوهش‌های گوناگونی را به‌منظور افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی گوشتی انجام داده‌اند که نشان از اهمیت بالای نگهداری این مواد غذایی حساس به فساد دارد. امروزه تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از مواد غذایی با ترکیبات نگهدارنده سنتزی و مصنوعی کمتر شده است و تقاضای برای محصولات باکیفیت، ارگانیک و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی را در مواد غذایی افزایش یافته است. از این‌رو استفاده از پوشش‌های خوراکی طبیعی به عنوان راه حلی برای افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی مورد توجه قرار گرفت و پژوهش‌های متعددی در توسعه و یا کاربرد پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مانند نشاسته، مشتقات سلولز، کیتین، کیتوزان، موسیلاژ، صمغ‌ها، ژلاتین و چربی در مواد غذایی مطرح شد. این ترکیبات جهت پوشش‌دهی غذاهای تازه و فرآوری شده و به‌منظور افزایش عمر ماندگاری آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sales, 1998; Fisher et al., 2000; Verma et al., 2017) که از آن جمله می‌توان استفاده از نشاسته به‌همراه اسانس سیر و پوست لیمو ترش برای افزایش ماندگاری فیله ماهی شیر (Rahmani et al., 2018)، موسیلاژ دانه بارهنگ به‌همراه اسانس شوید برای افزایش عمر ماندگاری گوشت گاو در یخچال (Alizadeh Behbahani et al., 2017)، کاربردپوشش خوراکی کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور بر روی کیفیت و ماندگاری گوشت مرغ در دمای یخچال (Hassanzadeh et al., 2011)، تأثیر پوشش و فیلم مخلوط خوراکی کیتوزان- ژلاتین بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و حسی ماهی شوریده بلانگر نگهداری شده در یخچال (Saki et al., 2017) و پلیمرهایی از این قبیل جهت تهیه پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر اشاره نمود. کیتوزان یک پلی‌ساکارید کاتیونی با وزن مولکولی بالا است که از استیله شدن کیتین تولید می‌شود و پلیمری بسیار مناسب برای حفاظت از ترکیبات فنولی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان مختلف است. کیتوزان توانایی بسیار بالایی در تشکیل فیلم و پوشش‌های خوراکی دارد. همچنین خاصیت ضدمیکروبی و بیوشیمیایی آن باعث شده است تا به‌عنوان پوشش‌های ضدمیکروبی مورد توجه قرار گیرند. تلفیق اسانس‌ها با کیتوزان باعث افزایش خصوصیات آنتی‌میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می شود و نفوذپذیری به بخار آب را کاهش می‌دهد (Giatrakou et al., 2010; Ojagh et al., 2010).

گیاه آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora Boiss* متعلق به خانواده Lamiaceae یکی از گیاهان دارویی است که به‌طور گسترده ای در نواحی گرمسیری ایران، پاکستان و افغانستان می‌روید (Behnam and Ali Akbarloo, 2013). این گیاه در طب سنتی به عنوان ضدعفونی‌کننده، ضدالتهاب و طعم‌دهنده در مواد غذایی به‌کار می‌رود. اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات ضدمیکروبی و ضداکسایشی می‌باشد که به‌طور عمده به ترکیبات فنولی آن نسبت داده می‌شود. هرچه میزان ترکیبات فنولی در اسانس بیشتر باشد فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی‌میکروبی اسانس نیز بیشتر خواهد بود. عمده‌ترین ترکیبات فنولی موجود در اسانس آویشن شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول است (Vilela et al., 2009). اسانس‌های گیاهی یکی از منابع بالقوه ترکیبات ضدباکتریایی و ضداکسایشی می‌باشند و برای این منظور بسیار موثر و مفید هستند (Girolami et al., 2003). مکانیسم اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی مرتبط با خواص آبگریزی آن‌ها است. این خاصیت منجر به نفوذ اسانس‌ها به داخل فسفولیپیدهای غشای باکتری‌ها و میتوکندری آن‌ها می‌شود و با ایجاد اختلال در ساختار آن ها نفوذپذیری را افزایش می‌دهند که منجر به خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی شده و در نهایت مرگ باکتری را در بر خواهد داشت (Nouri et al., 2012). در این پژوهش از تکنیک پوشش‌دهی (غوطه‌وری) توسط کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی در فیله‌های مرغ به‌منظور بالا بردن مدت زمان نگهداری در دمای یخچال استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده شامل؛ اسید بوریک، اسید استیک، گلیسرول، اکسید منیزیم، نشاسته، کربنات سدیم، DPPH از شرکت مرک (آلمان)، کیتوزان، معرف فولین سیوکالچوو توین ۸۰ (سیگما آلدریچ، آلمان)، معرف متیل رد و فنل رد، و محیط کشت پلیت کانت اگار و CFC/CN (کیولب، کانادا)، بوتانل (مجللی، ایران)، اسید تیوباربیتوریک (تیتراکم، امریکا) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss*) از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی مازندران- ساری، کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار و در آزمایشگاه شیمی و میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه رودکی انجام شده است.

استخراج اسانس

برای تهیه اسانس، گیاه آویشن شیرازی در فصل بهار از فروشگاه گیاهان دارویی ساری خریداری و توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی مازندران- ساری نام علمی آن تایید شد. اسانس آن به روش تقطیر با استفاده از روش کلونجر تهیه و سپس با سولفات سدیم

آبگیری و از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرونی عبور داده و درظروف تیره در دمای ۴ ˚C نگهداری شد (Rezaie et al., 2015).

آزمون اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد (DPPH)

برای اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال آزاد اسانس ۰/۳ میلی‌لیتر از اسانس آویشن شیرازی به ۳/۷ میلی لیتر محلول متانولی (۶×۱۰^۵) DPPH اضافه گردید و مخلوط حاصل به شدت همزده شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریک خانه‌گذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها خوانده شد. درصد مهار از طریق رابطه زیر محاسبه شد (Al-bahri et al., 2017).

$$DPPH\% = \frac{Sampleabsorb(nm) - DPPHabsorb(nm)}{DPPHabsorb(nm)} \quad (۱)$$

آزمون احیاءکنندگی (FRAP)

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی احیاء آهن، معرف FRAP در بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار، ۱۰ میلی‌مولار محلول TPTZ در محلول ۴۰ میلی‌مولار اسید کلریدریک و کلرید آهن ۳، ۲۰ میلی‌مولار در پروپیونات ۱۰:۱:۱ حجمی/ حجمی تهیه شد. واکنشگر FRAP به‌صورت روزانه و تازه تهیه شد و قبل از استفاده در بن ماری تا دمای ˚C ۳۷ گرم شد. ۵۰ میکرولیتر از عصاره های مختلف به ۳ میلی‌لیتر از واکنشگر FRAP اضافه شد. بعد از ۴ دقیقه جذب رنگی محصول (کمپلکس فروس تری پیریدیل تری‌آزین) در طول موج ۵۹۳ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از محلول آهن (II) سولفات (۳۰۰۰- صفر میکرومولار) خوانده شد و نتایج بر حسب میکرومول آهن (II) در میلی‌گرم وزن خشک عصاره (میکرومول بر میلی‌گرم) محاسبه شد (Benzie and Strain, 1996).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی اسانس آویشن شیرازی و فیلم کیتوزان با روش (Dorman et al., 2003) انجام شد. به این منظور غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالچو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه همزده شد. محلول کربنات سدیم با غلظت ۷۵ گرم در لیتر اضافه شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای اتاق توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ShimadzuUV-1280 با طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تهیه پوشش کیتوازن

تهیه محلول کیتوزان مطابق با روش Rao و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. بدین منظور پودر کیتوزان با وزن مولکولی و درجه داستیلاسیون (DD) بالارا در اسید استیک ۱٪ حل کرده تا محلول ۲٪ به‌دست آید. محلول به مدت یک شب در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی با دور ۱۰۰۰g همزده و با کاغذ صافی شماره ۳ صاف شد. سپس گلیسرول به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم کیتوزان به عنوان پلاستی‌سایزر و توئین ۸۰ به مقدار ۰/۲۵٪ به‌عنوان امولسیفایر اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق روی استیرر مخلوط گردید. pH محلول با استفاده از سود در حدود ۵/۸ تنظیم شد (Rao et al., 2010). برای نمونه‌های پوشش حاوی اسانس، اسانس به میزان ۱/۵٪ حجمی/ حجمی به محلول پوشش تهیه شده افزوده شد.

آماده سازی فیله‌های مرغ

لاشه‌های مرغ تازه به تاریخ کشتار روز از کشتارگاه سیرنگ (تنکابن) در فصل بهار تهیه و به‌صورت دستی فیله شدند. وزن فیله‌ها به‌طور متوسط ۱۰۰gr تا ۱۲۰ بود که پس از شستشو با آب، فیله‌ها جهت آب‌کشی بر روی آبکش پلاستیکی استریل قرار داده شدند.

پوشش‌دهی فیله‌های مرغ

نمونه‌های فیله مرغ به مدت ۳۰ ثانیه در محلول پوشش کیتوزان ۲٪ قرار داده شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود میکروبی در دمای محیط استریل قرار گرفتند تا خشک شوند. فیله‌های مرغ سپس در داخل ظروف پلاستیکی و در یخچال در دمای ۴ ˚C قرار داده شدند. آزمون‌های شیمیایی و میکروبی در فواصل زمانی صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ روز انجام شد (Nosratollahi et al., 2019).

آنالیز میکروبی

شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی (TMC) به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷˚C با محیط کشت پلیت کانت اگار و برای شمارش باکتری‌های سودوموناس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵˚C با محیط کشت CFC/CN انجام شد (ISIRI 5272, 2007).

آنالیز شیمیایی

اندازه گیری pH نمونه‌های فیله مرغ با استفاده از pHمتر انجام شد. ابتدا pHمتر با استفاده از بافرهای ۴، ۷ و ۹ کالیبره شد. ۱۰ گرم نمونه گوشت با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر هموژن شد و بعد از صاف کردن توسط کاغذ صافی pH مایع به‌دست آمده با استفاده از pHمتر اندازه‌گیری شد (Ionescu et al., 2008)، برای تعیین میزان TBA، ۱۰gr از نمونه در داخل لوله سانتریفوژ ۵۰ ml وزن شد و با اضافه کردن ۳۵ ml اسید پرکلریک ۴٪ و یک میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد BHT در اتانول هموژنیزه گردید. مخلوط توسط فیلتر کاغذی واتمن

شماره ۴ فیلتر شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده با ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۲ مولار TBA در داخل لوله آزمایش دربدار مخلوط گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها میزان جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول موج ۵۳۲ نانومتر در برابر محلول شاهد (۵ میلی‌لیتر اسیدپرکلریک ۴٪ و ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ میلی‌مول TBA) خوانده شد و میزان TBA بر اساس mg MDA/kg Fat محاسبه گردید (Pikul et al., 1989). برای اندازه‌گیری بازهای ازته فرار از روش Jeon و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. بدین منظور به بالن تقطیر کلدال ۱۰ gr از نمونه گوشت، ۲ gr اکسید منیزیم و ۳۰۰ml و چند قطعه سنگ جوش اضافه شد. در یک ارلن مایر به ظرفیت ۵۰۰ ml تا ۷۰۰ که به‌عنوان ظرف گیرنده زیر قسمت سرد کننده دستگاه تقطیر قرار گرفت ۲۵ ml از محلول ۲٪ اسید بوریک و چند قطره معرف متیل قرمز اضافه شد. بعد از انجام عملیات تقطیر محلول تقطیر شده به‌وسیله اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر و مقدار مصرف اسیدسولفوریک در عدد ۱۴ ضرب، و مقدار بازهای ازته فرار بر حسب mg N/100gr Flesh محاسبه شد (Jeon et al., 2002).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS version 22، آزمون آنالیز واریانس دو طرفه Two-way ANOVA و آزمون دانکن، برای مقایسه میانگین داده‌ها، و برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی، DPPH و FRAP در کیتوزان (۲٪) و اسانس آویشن شیرازی (۱/۵٪)

نتایج مقدار ترکیبات فنولی، درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH) و احیاء آهن (FRAP) آویشن شیرازی و کیتوزان در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- میزان ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی و پوشش کیتوزان

Table 1- Amount of phenolic compounds and antioxidant properties of thyme essential oil and chitosan coating

ماده Component	Phenolic(mg GA/g)	DPPH (%)	FRAP (µmol/g)
آویشن شیرازی Thyme essential oil	19.1± 2.3*	39.2±0.4*	25.7± 4.9*
کیتوزان Chitosan	8.34±2.1	14.3±2.1	10.1±1.25

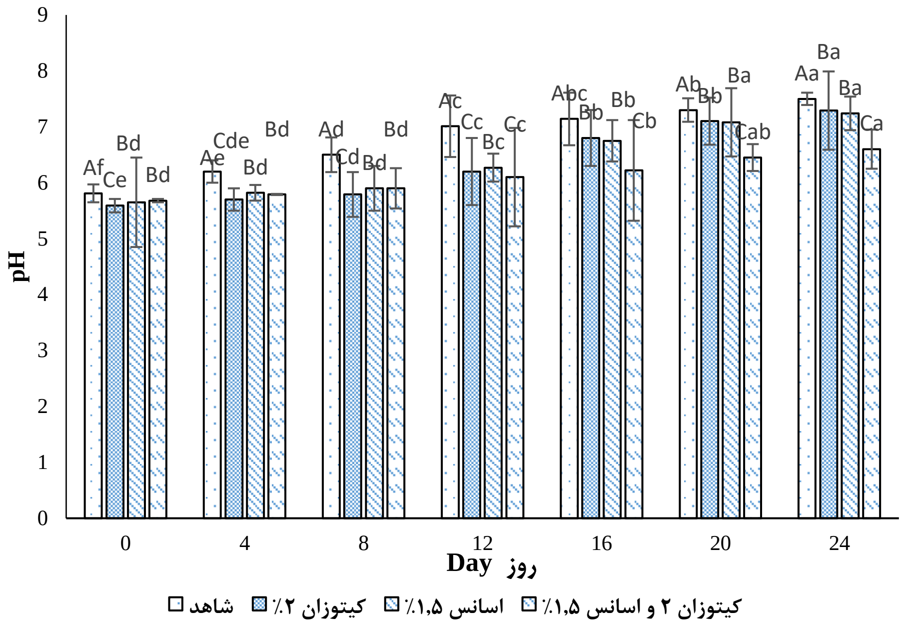
وجود علامت * بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) در هر شاخص بین دو اسانس می‌باشد

با توجه به نتایج جدول ۱ مقدار ترکیبات فنولی (mg GA/g)۱۹/۱ و ۸/۳۴، درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ۳۹/۲ و ۱۴/۲ و مقدار احیاء آهن (µmol/g) ۲۵/۷ و ۱۰/۱ به‌ترتیب در آویشن شیرازی و کیتوزان، مشخص شد که اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان هر دو دارای دارای ترکیبات فنولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی خوبی هستند که به‌دلیل وجود ترکیباتی مانند کارواکرول و تیمول (حدود ۷۰٪ کل ترکیبات اسانس) و همچنین ترکیبات آلفاپینن، پی‌سیمن، گاماترپینن، آلفاترپینن، لینالول در اسانس آویشن شیرازی و وجود بار مثبت در مولکول‌های کیتوزان می‌باشد (Bagamboula et al., 2004; Moradi et al., 2010; Kashiri et al., 2016; Arya et al., 2019). در پژوهش‌های متعددی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت که مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر عبارتند از؛ اثر اسانس آویشن شیرازی و مرزه بر گوشت مرغ طی نگهداری در یخچال (Behnam and Aliakbarlou, 2013)، اسانس آویشن شیرازی، پونه کوهی و مخلوط آن‌ها برکیفیت گوشت بلدرچین در مقایسه با آنتی‌بیوتیک ویرجینامایسین، اثرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره ادویه‌ها بر افزایش ماندگاری گوشت مرغ خام (Babuskin et al., 2014) و تهیه و ارزیابی فیلم زیست تخریب‌پذیر کیتوزان و اسانس دارچین بر کیفیت قزل‌آلای رنگین کمان بود (Ojagh et al., 2010).

اندازه‌گیری pH

شکل ۱ نتایج تاثیر پوشش خوراکی کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی بر pH فیله مرغ طی نگهداری در یخچال را نشان می‌دهد. مقدار pH در همه تیمارها روند افزایشی داشته است. میزان pH اولیه در تیمار شاهد ۵/۸۱ بود که در روز ۲۴ نگهداری به ۷/۵ رسیده است. تغییرات pH در فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی از ۵/۶۸ در روز اول نگهداری به ۶/۶ در روز ۲۴ نگهداری در یخچال رسید و کمترین تغییرات میزان pH را طی دوره نگهداری داشته است (p<۰/۰۵). چنین نتایجی در پژوهش Ruiz-

Capillas و Moral (۲۰۰۱) دیده شد. آنها دلیل افزایش pH طی دوره نگهداری را ناشی از فعالیت باکتری‌ها و آنزیم‌های داخلی و تولید ترکیبات ازته فرار مانند آمونیاک (NH_3)، تری‌متیل آمین (TMA)، دی متیل آمین (DMA) و آمین‌های بیوژن (BA) دانستند (Ruiz-Capillas and Moral, 2001). در بررسی تأثیر اسانس لیموترش و گشنیز به‌کار رفته در پوشش کربوکسی متیل سلولز (CMC) بر pH گوشت توسط Hosseini و همکاران (۲۰۱۴) اعلام شد که میزان pH در نمونه‌هایی دارای پوشش CMC و فاقد اسانس، بالاتر می‌باشد. دلیل این امر را عدم وجود ترکیبات فنولی در گوشت دارای پوشش CMC ذکر شد که باعث فعالیت بیشتر میکروارگانیسم‌ها در گوشت و به دنبال آن تجزیه پروتئین و تولید ترکیبات ازته فرار و ایجاد خاصیت بازی در گوشت شده است (Hosseini et al., 2014). اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان با مهار باکتری‌های پروتئولیتیک فساد بافت پروتئینی را به تأخیر انداخته در نتیجه pH پایین‌تری نسبت به تیمار شاهد نشان می دهد (Gill, 1983; Behnam and Aliakbarlou, 2013).



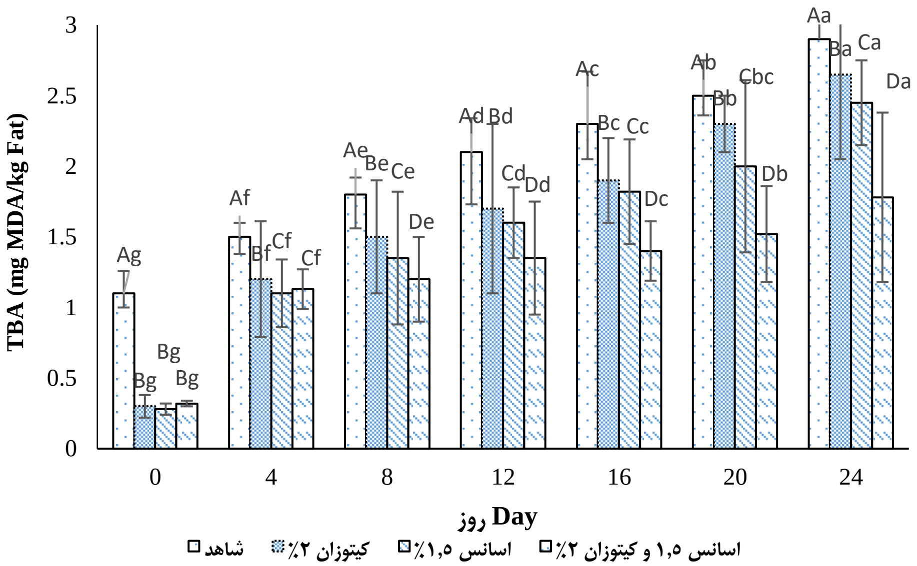
شکل ۱- تغییرات pH نمونه های فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال(حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد)

Fig. 1. PH changes of chicken fillet samples during the storage period in the refrigerator

اندازه‌گیری شاخص TBA

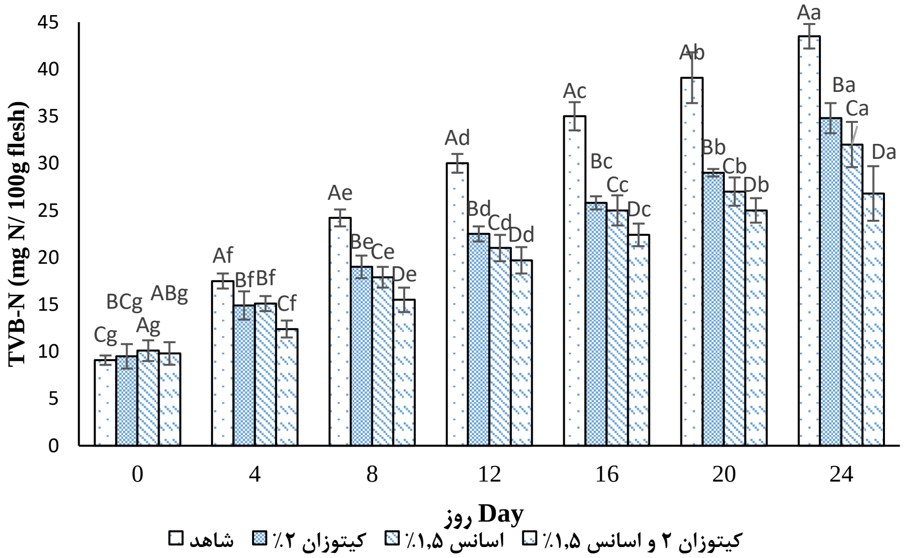
اکسیداسیون چربی‌ها باعث ایجاد ترکیباتی مانند آلدئید، کتون، اسید و الکل می‌شود که متعاقب آن باعث ایجاد تغییراتی در عطر، طعم و ارزش تغذیه‌ای فرآورده‌های گوشتی می‌شود (Babuskin et al., 2014). شاخص TBA، یکی از شاخص های ارزیابی میزان اکسیداسیون چربی است که میزان محصولات ثانویه اکسیداسیون مانند آلدهیدها و کتون‌ها را نشان می دهد (Kostaki et al., 2009) که از شکست شدن و یا اکسید شدن ترکیبات هیدروپراکسیدها ایجاد می‌شود (Gimenez et al., 2002). نتایج تغییرات شاخص اسیدتیوباربیتوریک تیمارهای مختلف در شکل ۲ نشان داده شد. که طی مدت نگهداری در یخچال شاخص اسید تیوباربیتوریک در تمام نمونه‌ها افزایش یافته است. میزان شاخص TBAدر روز ۲۴ نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲، اسانس ۱/۵٪، و پوشش کیتوزان ۲٪ حاوی ۱/۵٪ آویشن شیرازی به‌ترتیب ۲/۹، ۲/۶۵، ۲/۴۵ و ۱/۷۸ میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدهید بر کیلوگرم چربی بود. بیشترین و کمترین میزان TBA به‌ترتیب در نمونه شاهد و نمونه‌های فیله مرغ تیمار شده با پوشش کیتوزان حاوی اسانس آویشن مشاهده شد. اختلاف بین تیمار شاهد با دیگر تیمارها طی دوره نگهداری در یخچال معنی‌دار بود ($p<0/05$). انجام پژوهش های متعدد در زمینه به‌کارگیری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نشان داد که افزودن اسانس و عصاره های گیاهی به روغن‌ها و اسیدهای چرب غیراشباع، اکسیداسیون را کند و یا متوقف می‌کند (Yanishlieva et al., 2006). سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس زیره سیاه با شاخص اسید تیوباربیتوریک نشان داد که اسانس زیره سیاه به دلیل وجود ترکیبات آلفاسیمن، آلفالانگیپنین، لانگیفولن، کارواکرول، تیموکینون و تیموهیدروکینون فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر از آنتی‌اکسیدانی مصنوعی

و توانایی کاهش TBA، در تیمارهای مورد مطالعه را دارد (Singh et al., 2014).



شکل ۲- تغییرات اسید تیوباربیتوریک (TBA) نمونه‌های فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 2. Changes of thiobarbituric acid (TBA) of chicken fillet samples during the storage period in the refrigerator



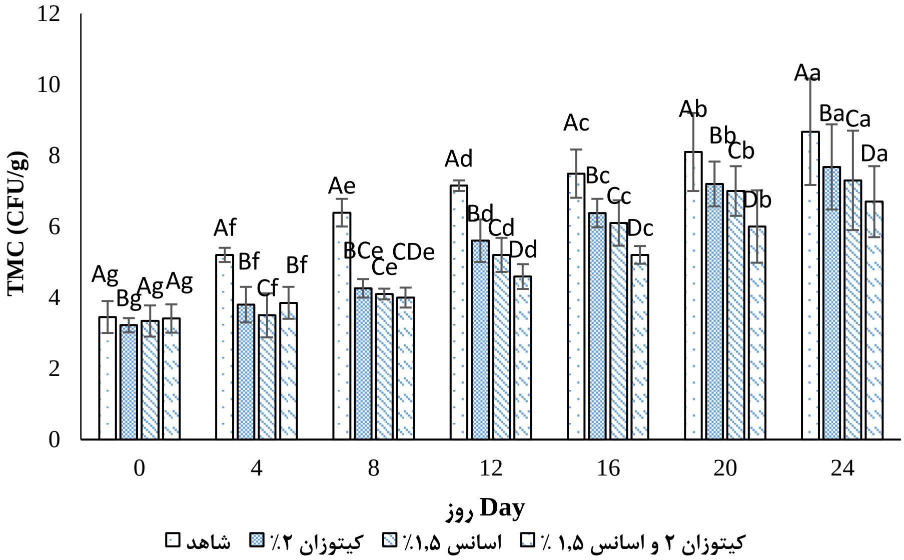
شکل ۳- تغییرات بازهای ازته فرار (TVB-N) نمونه‌های فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 3. Changes of total volatile nitrogen bases nitrogen (TVB-N) of chicken fillet samples during the storage period in the refrigerator

اندازه‌گیری شاخص TVB-N

شاخص (TVB-N)، یکی از مهمترین شاخص‌های شیمیایی تعیین کننده فساد فرآورده‌های گوشتی نظیر گوشت مرغ می‌باشد. بازهای ازته فرار یک اصطلاح کلی برای مجموع ترکیبات تری‌متیل آمین (TMA)، دی‌متیل آمین (DMA)،آمونیاک، نوکلئوتیدها و دیگر ترکیبات فرار که در آنها نیتروژن وجود دارد که در نتیجه فعالیت باکتری‌های عامل فساد

و آنزیم‌های داخلی که با دآمیناسیون اسیدهای آمینه و کاتابولیسم نوکلوتیدها، تولید می‌شوند (Cakli et al., 2005; Razavi Shirazi, 2007; Li et al., 2012) و حد مجاز ترکیبات ازته فرار (TVB-N) در فیله مرغ ۲۸-۲۹ mg N/100g Flesh تعیین شده است (Balamatsia et al., 2006). به‌طورکلی بین میزان تولید بازهای ازته فرار و رشد باکتریایی رابطه مستقیمی وجود دارد. از آنجایی که در نمونه شاهد که تعداد باکتری‌های بیشتری رشد نموده، لذا میزان TVB-N بیشتری تولید شده است (Gram and Huss, 1996). شکل ۳، مقادیر ترکیبات ازته فرار (TVB-N) در تیمارهای مورد مطالعه طی دوره نگهداری را نشان می‌دهد. در تمام تیمارها میزان ترکیبات ازته فرار طی دوره نگهداری در یخچال افزایش یافته است. میزان این ترکیبات در روز صفر نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس ۱/۵٪ و پوشش کیتوزان ۲٪ حاوی آویشن شیرازی با غلظت ۱/۵٪ به‌ترتیب ۹/۰۹، ۹/۵، ۱۰/۱ و ۹/۸ بود که در روز ۲۴ نگهداری ۴۳/۵، ۳۴/۸، ۳۲ و ۲۶/۸ mg N/100g Flesh شد. نمونه شاهد بیشترین و نمونه پوشش دهی شده با کیتوزان حاوی اسانس کمترین میزان بازهای ازته فرار را طی دوره نگهداری داشته است. اختلاف بین تیمارها به جز روز صفر نگهداری معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵). وجود ترکیبات ضدمیکروبی و ضداکسایشی در اسانس و عصاره گیاهان باعث کاهش جمعیت باکتریایی و یا کاهش ظرفیت باکتری‌ها برای دآمیناسیون اکسیداتیو نیتروژن غیرپروتئینی ترکیبات و یا هر دوی آن‌ها می‌شود (Fan et al., 2008). چنین نتایجی در مطالعه تهیه و ارزیابی فیلم زیست تخریب پذیر کیتوزان و اسانس دارچین بر کیفیت قزل‌آلای رنگین کمان (Ojagh et al., 2010) و افزایش ماندگاری ماهی کپور با استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی طی دوره نگهداری در یخچال (Li et al., 2012) مشاهده شد. اسانس آویشن شیرازی به علت داشتن ترکیبات فنولی مانند تیمول و کارواکرول، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی باکتریایی بسیار خوبی می‌باشد.



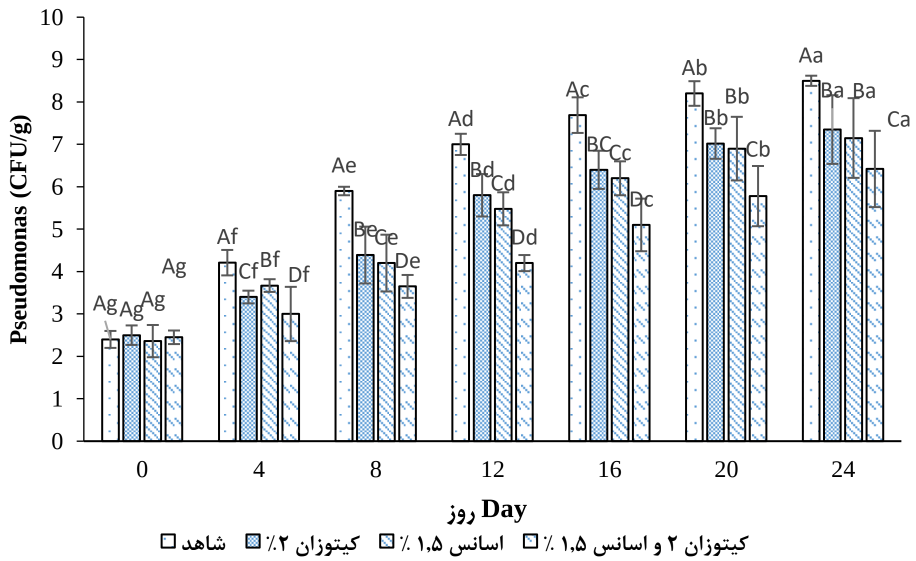
شکل ٤- تغییرات تعداد باکتری‌های مزوفیل (CFU/g) تیمارهای فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 4. Changes in the mesophilic bacteria (CFU/g) of chicken fillet treatments during the period of storage in the refrigerator

شمارش باکتری‌های مزوفیل (TMC) و سودوموناس در فیله مرغ

کنترل میکروارگانیسم‌های ویژه فساد (SSOs)، بهداشت و ایمنی مواد غذایی چالشی بسیار مهم در صنعت غذا محسوب می‌شود. استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی جایگزینی سالم و مناسب نسبت به نگهدارنده های سنتزی جهت حفظ کیفیت و نگهداری مواد غذایی می‌باشند (Elizaquível et al., 2013). به‌طور کلی تعداد باکتری‌های مزوفیل و سودوموناس (شکل ۴ و ۵) طی دوره نگهداری در یخچال روند افزایشی داشته است به نحوی که در روز صفر نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ و تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به ترتیب تعداد باکتری‌های مزوفیل CFU/g ۳/۴۵، ۳/۲۲، ۳/۳۴ و ۳/۴۱ بود و در پایان دوره ۸/۶۷، ۷/۶۸، ۷/۳ و ۶/۷ شد با توجه به این که سازمان دامپزشکی حد مجاز باکتری‌های مزوفیل در فیله مرغ را $cfug^{-1}$ ۷ تعیین نموده است. بنابراین تعداد باکتری‌های مزوفیل در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب در روزهای ۱۲، ۲۰ و ۲۰ از حد مجاز فراتر رفته است ولی تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ تا پایان دوره

نگهداری در یخچال کمتر از حد مجاز بوده است (p<۰/۰۵). بیشترین میزان رشد باکتری‌های مزوفیل در نمونه شاهد مشاهده گردید. تعداد باکتری‌های سودوموناس در روز اول نگهداری در تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ و تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب ۲/۴ CFU/g، ۲/۵، ۲/۳۶ و ۲/۴۵ بوده است و تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۰۵). به تدریج با افزایش زمان نگهداری بر تعداد باکتری‌ها افزوده می‌شود به‌طوری که در روز ۲۴ نگهداری در تیمار شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ و تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ و اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب به ۸/۵، ۷/۳۵، ۷/۱۵ و ۶/۴۵ رسیده و اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵). تعداد باکتری های سودوموناس در تیمار شاهد در روز ۸ و در تیمارهای کیتوزان ۲٪ و آویشن شیرازی ۱/۵٪ در روز ۱۶ و تیمار فیله مرغ پوشش داده شده با کیتوزان ۲٪ حاوی اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ در روز ۲۴ از حد مجاز فراتر رفته است.



شکل ۵- تغییرات تعداد باکتری های سودوموناس (CFU/g) تیمارهای فیله مرغ طی دوره نگهداری در یخچال (حروف بزرگ بیانگر اختلاف بین تیمارها در یک روز و حروف کوچک بیانگر اختلاف بین هر تیمار طی دوره نگهداری می‌باشد).

Fig. 5. Changes in Pseudomonas bacteria (CFU/g) of chicken fillet treatments during the storage period in the refrigerator

Kashiri و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی خاصیت ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی را با استفاده از روش‌های حداقل غلظت کشندگی (MBC) و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بررسی نمودند، مشخص شد که اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی را می‌توان به ترکیبات کارواکرول و تیمول و توانایی آنها در برقراری پیوندهای هیدروژنی این ترکیبات با سایر مونوترپن‌ها نظیر گاماترپینن‌ها و بروز اثرات سینرژیستی نسبت داد که در نهایت منجر به بی‌ثباتی غشاء سلولی باکتری ها می‌گردد (Kashiri et al., 2016). اسانس آویشن شیرازی به دلیل دارا بودن ترکیب فنولی کارواکرول و تیمول دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و E.coli است که تأییدکننده نتایج تحقیق می‌باشد (Elizaquível et al., 2013). ترکیبات ضدمیکروبی فرار اسانس از طریق مهاجرت در فضای موجود در بسته‌بندی و ترکیبات ضدمیکروبی غیرفرار به صورت مواد حل شونده در تماس بین ماده بسته‌بندی و غذا می‌توانند اثرات ضدمیکروبی خود را بروز دهند (Shan et al., 2007). لذا در نمونه‌های فیله مرغ تیمار شده با پوشش کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی به دلیل وجود ترکیبات فنولی در آویشن طی دوره نگهداری از طریق پوشش به گوشت وارد می‌شوند و بر باکتری‌های گوشت اثرات ضدمیکروبی خود را وارد می کنند از طرفی پوشش کیتوزان هم دارای خاصیت ضدمیکروبی و ضداکسایشی می‌باشد. اندازه گیری فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی توسط Calatayud و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد و اعلام نمودند که اسانس در محیطهای مایع عملکرد بسیار خوبی دارند (Calatayud et al., 2013). میزان رهایش ماده موثره و شدت کاهش جمعیت میکروبی به نوع پوشش استفاده شده نیز بستگی دارد لذا زمانی که اسانس در ساختار پوشش قرار می‌گیرد رهایش بهتری دارد و اثرات ضدمیکروبی آن بالاتر است (Muriel-Galet et al., 2012). استفاده

از پوشش خوراکی کیتوزان و پکتین غنی شده با اسانس لیمو و فلفل عمر ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلا را افزایش داد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Tabatabaei moradi et al., 2015). این نتایج حاصل فعالیت مواد ضدمیکروبی و ضداکسایشی اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان، که با ایجاد اختلال در غشای سیتوپلاسمی، نیروی محرکه پروتونی، جریان الکترون‌ها، انتقال فعال و انعقاد محتویات سلول، اثرات خود را اعمال می‌کنند، می‌باشد (Burt, 2004, Prashanth and Tharanathan, 2007).

نتیجه‌گیری

استفاده از پلیمرهای زیستی مانند کیتوزان، ژلاتین و غیره که توانایی خوبی در نگهداری و رهایش ترکیبات ضداکسیدانی و ضدمیکروبی دارند، در بسته‌بندی مواد غذایی رو به افزایش می‌باشد. در این پژوهش اثرات نگهدارندگی پوشش کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی در افزایش عمر ماندگاری فیله مرغ بررسی شد و مشخص گردید که پوشش کیتوزان و اسانس آویشن شیرازی به تنهایی و به صورت توأم، اثرات نگهدارندگی خوبی داشته‌اند. با توجه به نتایج، پوشش ۲٪ کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ می‌تواند عمر ماندگاری فیله مرغ را افزایش دهد که این نتیجه ناشی از عملکرد خیلی خوب پوشش کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی به دلیل وجود اثر هم‌افزایی در خواص ضدمیکروبی و ضداکسایشی بین پوشش کیتوزان و اسانس آویشن در جلوگیری از رشد میکروبی و فساد شیمیایی بودو مدت ماندگاری برای تیمارهای شاهد، کیتوزان ۲٪، اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪، و پوشش کیتوزان ۲٪ حاوی اسانس آویشن شیرازی ۱/۵٪ به‌ترتیب ۸، ۱۶، ۱۶ و ۲۴ روز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم موسسه آموزش عالی رودکی که در انجام این پروژه همکاری نموده‌اند، کمال تشکر را داریم

منابع

1. Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, Allured publishing corporation Carol Stream, IL. 60188, USA ISBN 0-931710-85-5 2001. 469pp.
2. Al-bahri, A. Denaro, M Barreca D. et al. (2017). In vitro evaluation of the antioxidant, cytoprotective, and antimicrobial properties of essential oil from *Pistacia vera* L. variety bronte hull, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1212- 21. https://doi.org/10.3390/ijms18061212
3. Alizadeh Behbahani , B., Shahidi, F., TabatabaeiYazdi, F., Mortazavi, S. A., Mohebbi, M. (2017). Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*,94, 515-526. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055
4. Arya, A., Mendiratta, S., Agarwal, R., Bharti, S. & Umarao, P. (2019). Antimicrobial profile and organoleptic acceptability of some essentials oils and their blends in hurdle treated chicken meat spread. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 8, 2162-2177.
5. Babuskin, S., Babu, P. A. S., Sasikala, M., Sabina, K., Archana, G., Sivarajan, M. & Sukumar, M. (2014). Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International journal of food microbiology*, 171, 32-40. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.011
6. Bagamboula, C., Uyttenaele, M. & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigellasonne*i and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21, 33-42. https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7
7. Balamatsia, C. C., Rogga, K., Badeka, A., Kontominas, M. G. & Savvaidis, I. N. (2006). Effect of low-dose radiation on microbiological, chemical, and sensory characteristics of chicken meat stored aerobically at 4°C. J*ournal of food protection*, 69, 1126-1133.
8. Behnam, B. & Aliakbarlo, J. (2013). Antioxidant effect of thyme essential oil and oregano on chicken meat kept at 4ºC. *Food Industry Research* (*Agricultural Knowledge*), 23, 533-543.
9. Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239, 70-76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292
10. Burt, S. (2004). Essential oils :their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. I*nternational journal of food microbiology*, 94, 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
11. Cakli, S., Taskaya, L., Kisla, D., Çekil, U., Atamann, C. A., Cadun, A., Kilinc, B. & Maleki, R. H. (2005). Production andquality of fish fingers from different fish species. *European Food Research and Technology*, 220, 526-530. https://doi.org/10.1007/s00217-004-1089-9
12. Calatayud, M., Lopez-de-dicastillo, C., Lopez-Carballo, G., Velez, D., Hernandezmunoz, P. & Gavara, R. (2013). Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. *Food Chemistry*, 139, 51-58. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.097

13. Dorman, H., Peltoketo, A., Hiltunen, R. & Tikkanen, M. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, 83, 255-262. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.036
14. Elizaquivel, P., Azizkhani, M., Sanchez, G. & Aznar, R. (2013). Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil activity against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables .*Food control*, 34, 770-776. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.036
15. Fan, W., Chi, Y. & Zhang, S. (2008). The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmicthys molitrix*) during storage in ice. *Food chemistry*, 108, 148-153.
16. Fazlara, A., Pourmehdibroujni, M. & Molaei, F. (2017). The effect of Shirazi-Thyme gelatin coating on microbial, chemical and sensory properties of ostrich fillets in refrigerated conditions. *Iranian Food Science and Technology*, 14, 141-155.
17. Fisher, P., Hoffman, L. C. & Mellett, F. D. (2000). Processing and nutritional characteristics of value added ostrich products. *Meat Science*, 55, 251-4. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00139-4
18. Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Savvaidis, I. N. (2010). Combined chitosan-thyme treatments with modified atmosphere packaging on a ready-to-cook poultry product. J*ournal of Food Product*, 73, 663-9.
19. Gill, C. O, (1983). Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *Journal of Food Protection*, 46, 444-452.
20. Gimenez, B., Roncales, P. & Beltran, J. A. (2002). Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1154-1159.
21. Girolami, A., Marsico, I., D'andrea, G., Braghieri, A., Napolitano, F. & Cifuni, G. (2003). Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of ostrich meat as influenced by age at slaughter and muscle type. *Meat Science*, 64, 309-315. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00202-4
22. Gram, L. & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products .International Journal of Food Microbiology, 33, 121-37. https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8
23. Hajypourdehbalaei, S., Afsharmanesh, M. & Sami, M. (2015). The effect of thyme essential oil, oregano and their mixture on the quality of quail meat in comparison with the antibiotic virginiamycin. *Food Hygiene*, 5, 45-54.
24. Hosseini, M. M., Sedaghat, N., Khoshnodnia, S., Habibinajafi, M. & Kouchaki, A. (2014). Physical and mechanical properties of carboxymethylcellulose film containing plant essential oil and its effect on mutton color. *Food Industry Research* (Agricultural Knowledge), 24, 519-529.
25. Ionescu, A., Aprodu, I. & Pascaru, G. (2008). Effectof Papainand Bromelinonmuscleandcollagen proteinsin beef meat. Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI-*Food Technology*, 1, 9-16.
26. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Holistic approach to total count of microorganisms- Colony count technique at 30 degrees Celsius. National Standard No. 5272.
27. Jeon, Y.J., Kamil, J. Y. & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 5167-5178.
28. Hassanzadeh, P., Tajik, H. and Razavi Rohani, M. (2011). Application of chitosan edible coatingcontaining grape seed extract on the quality and shelf life of refrigerated chicken meat. *Journal of Food Industry Researc*h, 21 (4), 467-482.
29. Kashiri, M., Maghsoudloo, Y., Khamiri, M. & Behrooz, R. (2016). Evaluation of antibacterial properties of bioactive zein film containing *Zataria multiflora* essential oil. *Iranian Food Science and Technology*, 13, 195-206.
30. Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N. & Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, 26, 475-82. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.008
31. Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X ,.Li, X. & Zhao, J. (2012). Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage. *Food Chemistry*, 135, 140-145. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.115
32. Moradi, M., Tajik, H., No, H. K., Razavi Rohani, S., Oromiehie, A. & Ghasemi, S. (2010). Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. *Journal of Chitin &Chitosan*, 15, 35-45.
33. Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., Lopez-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R. & Hernandez-Munoz, P. (2012). Development of antimicrobial filmsfor microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 195-201. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.002
34. Nosratollahi, K. Barzegar, H. Jooyandeh, H. Ghorbani, M. R. (2018). Effect of savory (*Satureja hortensis*) extract on the quality and shelf-life of raw chicken meat stored at refrigerator. *Journal oF food Science and Technology*, 82(15), 167-177.

35. Nouri, N., Rokni, N., Basti, A. Z., Misaghi, A., Dabbaghmoghadam, A., Yahyarait, R. & Ghanbari Saqarloo, N. (2012). Antimicrobial effect of Zataria multiflora essential oil on *E.coli* O157: H7 in ground beef during storage at refrigerated temperature to be replaced with chemical preservatives and to ensure consumer health. *Journal of Army University of Medical Sciences of the Islamic Republic of Iran*,10(3), 192-197.
36. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food chemistr*y, 120, 193-198. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.006
37. Pikul, J., Leszczynski, D. E. & Kummerow, F .A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1309-1313.
38. Prashanth, K. H. & Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in food science & technology*, 18, 117-131. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022
39. Ojagh S. M, Rezaei M, Razavi S. H, Hosseini S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *FoodChemistry*, 122, 161- 166. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033
40. Rao, M., Kanatt, S., Chawla, S. & Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*,82, 1243-1247. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.058
41. Rahmani, S., Nikpour, H., Sharifian, A. (2018). Application of garlic essential oil and sour lemon peel in the structure of active food coating based on starch in order to increase the shelf life of milk fish fillets. Congress for the Development of Regional Scientific Cooperation in Food Industry and Agriculture, COI: CFAS01_368, 21
42. Razavi Shirazi, S. H. (2007). Seafood Technology Principles of Maintenance and Processing, 382.
43. Rezaie, M., Farnoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A. & Golmohamadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (Pistacia atlantica subsp. mutica) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food chemistry*, 173, 577-583. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.081
44. Ruiz-Capillas, C. & Moral, A. (2001). Residual effect of CO_2 on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, 212, 413-420. https://doi.org/10.1007/s002170000270
45. Saki, J., Khodanazary, A., Hosseini, S. M. (2017). The effect of chitosan-gelatin composition and bi-layer coating and film on physicochemical, microbial and sensory properties of johnius belangeriistored at refrigerator. J*ournal of Research and Innovation in Food Science and Industry*,6 (1), 71-86.Doi: 10.22101/JRIFST.2017.05.22.616
46. Sales, J. (1998). Fatty acid composition and cholesterol content of different ostrich muscles. *Meat Science*, 49, 489-92. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00052-7
47. Seydim, A. C., Acton, J .C., Hall, M. A. & Dawson, P. L. (2006). Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Science*, 73, 503-10. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.01.010
48. Shan, B., Cal, Y. Z., Brooks, J. D. & Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomumburmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 55, 5484-90.
49. Singh, S., Das, S., Singh, G., Schuff, C., De-Lampasona, M. P. & Catalan, C. A. (2014). Composition, in vitro antioxidant and antimicrobialactivities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigellasativa* L.). B*iotechnology Medical research international*, 1-11.
50. Tabatabaeimoradi, L., Sharifian, A. & Larijani, K. (2015). Antimicrobial activity of lemon and peppermint essential oil in edible coating containing chitosan and pectin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 3, 38-43.
51. Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K. K., Kaur, S. & Dhilon, G. S. (2017). Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Critical Review in Biotechnolcal*, 37, 476-491. https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1185388
52. Vernozy-Rozand, C., Ray-Gueniot, S., Ragot, C., Bavai, C., Mazuy, C., Montet, M. P., Bouvet, J. & Richard, Y. 2002. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef. *Lettersin Applied Microbiology*, 35, 7-11.
53. Vilela, G. R., Dealmeida, G. S., Darce, M. A. B. R., Moraes, M. H. D., Brito, J. O., Da Silva, M. F. D. G., Silva, S. C., De Stefanopiedade, S. M., Calori-Domingues, M. A. & Da Gloria, E. M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from Eucalyptus globulus Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and Aspergillus parasiticus Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45, 108-111. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2008.10.006
54. Yanishlieva, N. V., Marinova, E. & Pokorny, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of lipid science and Technology*, 108, 776-793. https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127